UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS CENTRO DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



# Trabalho de Conclusão de Curso

# Estudo da ação da Berberina associada à Terapia Fotodinâmica em Células de Carcinoma Cervical

Patricia Mendonça Oliveira

Pelotas, 2018

Patricia Mendonça Oliveira

# Estudo da ação da Berberina associada à Terapia Fotodinâmica em Células de Carcinoma Cervical

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora acadêmica: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Marques Moura de Leon

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação na Publicação

O48e Oliveira, Patricia Mendonça

Estudo da ação da berberina associada à terapia fotodinâmica em células de carcinoma cervical / Patricia Mendonça Oliveira ; Marilia de Freitas Calmon, Priscila Marques Moura de Leon, orientadoras; Tairine Zara Lopes, coorientadora. – Pelotas, 2018.

57 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Composto natural. 2. Fotossensibilizador. 3. Irradiação. 4. Fototoxicidade. 5. Câncer ginecológico. I. Calmon, Marilia de Freitas, orient. II. Leon, Priscila Marques Moura de, orient. III. Lopes, Tairine Zara, coorient. IV. Título.

CDD:616.99465

# Patricia Mendonça Oliveira

# Estudo da ação da Berberina associada à Terapia Fotodinâmica em Células de Carcinoma Cervical

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 19/11/2018

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>. Priscila Marques Moura de Leon (orientadora acadêmica) Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>. Marilia de Freitas Calmon (supervisora de estágio) Doutora em Genética pela Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho

Prof<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>. Thaís Larré Oliveira Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Severo Sabreda Sousa Doutora em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e ao divino que habita cada um de nós.

# Agradecimentos

Agradeço à minha família, mãe, pai e irmãos, graças a eles consegui chegar até aqui.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilia de Freitas Calmon por me orientar na elaboração e execução do projeto de TCC e pelos ensinamentos.

À MCs. Tairine Zara Lopes por todo o auxílio dado durante a execução do projeto de TCC e pela parceria.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Rahal, por me receber no seu laboratório e pelos momentos compartilhados.

À UNESP de são José Do Rio Preto (IBILCE), local no qual realizei intercâmbio e onde desenvolvi meu projeto de TCC.

À minha orientadora acadêmica, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Marques Moura de Leon, por todo suporte dado.

A todos os integrantes do Laboratório de Estudos Genômicos, pelos momentos compartilhados.

A todos os meus amigos.

A todos, não citados, que cruzaram meu caminho durante essa jornada, e direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento pessoal.

E por fim, ao UNIVERSO e à FORÇA DIVINA MAIOR, que me guia, fortalece e protege.

"EU SOU, PORQUE NÓS SOMOS!"

"Entrego, confio, aceito e agradeço!" (Professor HERMÓGENES)

#### Resumo

OLIVEIRA, Patricia Mendonça. Estudo da ação da Berberina associada a Terapia Fotodinâmica em Células de Carcinoma Cervical, 2018. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O câncer cervical é um grave problema de saúde pública a nível mundial. Diante dos efeitos nocivos e da invasividade das terapêuticas convencionais atuais, a terapia fotodinâmica surge como uma opção minimamente invasiva e que pode promover uma atividade citotóxica seletiva para células neoplásicas. A sua ação se dá na presença de três componentes: um agente fotossensibilizante, a luz e o oxigênio molecular. Mediante a isso, a berberina surge como alternativa, por se tratar de um composto natural que possui propriedades antineoplásicas, com efeito sobre diferentes alvos moleculares e vias de sinalização, e por possuir um potencial como agente fotossensibilizador na terapia fotodinâmica. O objetivo deste estudo foi utilizar a berberina como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica e observar os efeitos produzidos por esta associação em células de carcinoma cervical (CaSki), utilizando como parâmetro de comparação células de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). A partir de um ensaio colorimétrico, no qual células viáveis pela ação de enzimas mitocondriais reduz o tetrazólio MTT à cristais de formazan, foi possível calcular a viabilidade celular. A partir dos valores obtidos, observamos que o aumento da concentração da berberina, assim como um tempo maior de contato com o composto levou a uma diminuição da viabilidade celular. A incubação com 2,5 µM de berberina mostrou uma viabilidade celular de 92,97 e 92,02%, nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente, para as células CaSki, enquanto nas células HaCaT foi de 97,09 e 96,79% para os mesmos períodos. Em adição a isto, através de microscopia de fluorescência mostrou-se que a berberina foi internalizada pelas células, e após um período de 48 horas ela ainda estava presente no meio intracelular de ambas linhagens. Após a terapia fotodinâmica utilizando a berberina como fotossensibilizador, observamos um efeito fototóxico estatisticamente significante, resultando em 19,84% de células viáveis na linhagem CaSki e 47,22% na HaCaT, o que mostra uma efetividade maior nas células tumorais. A partir de um ensaio colorimétrico específico e leitura da absorbância em espectrofotômetro foi obtido a atividade de caspase-3, a qual não foi expressiva diante do efeito fototóxico causado pela terapia fotodinâmica na linhagem tumoral, sugerindo morte por outros mecanismos, como autofagia, necrose e apoptose por via independente de caspase. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a berberina é um eficiente fotossensibilizador quando associado a terapia fotodinâmica, uma vez que foi capaz de promover diminuição significativa da viabilidade celular em células de carcinoma cervical.

**Palavras-chave**: composto natural; fotossensibilizador; irradiação; fototoxicidade; câncer ginecológico.

### Abstract

OLIVEIRA, Patricia Mendonça. Study of the action of Berberine associated with **Photodynamic Therapy in Cervical Carcinoma Cells**, 2018. 57f. Final project (Biotechnology Undergraduate Program) - Bachelor of Biotechnology, Technology Development Center, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Cervical cancer is a serious worldwide public health problem. In view of the harmful effects and the invasiveness of current conventional therapies, Photodynamic Therapy appears as a less invasive and less cytotoxic option. Its action occurs in the presence of three components: a photosensitizing agent, light and molecular oxygen. Thus, berberine appears as an alternative because it is a natural compound with antineoplastic properties, with effect on different molecular targets and signaling pathways and possesses a potential as a photosensitizer agent in Photodynamic Therapy. The objective of this study was to use berberine as a photosensitizer in Photodynamic Therapy and to observe the effects produced by this association in cervical carcinoma cells (CaSki), using human keratinocyte cells (HaCaT) as a parameter. From a colorimetric assay, in which viable cells by the action of mitochondrial enzymes reduces tetrazolium MTT to formazan crystals, it was possible to calculate cell viability. From the values obtained, we observed that increasing the berberine concentration, as well as a longer contact with the compound led to a decrease in cell viability. Incubation with 2.5 µM berberine showed a cell viability of 92.97 and 92.02%, at the 24 and 48 hour times, respectively, for the CaSki cells, while in the HaCaT cells it was 97.09 and 96.79% for the same periods. In addition, by fluorescence microscopy it was shown that berberine was internalized by the cells, and after a period of 48 hours it was still present in the intracellular medium of both cell lines. After photodynamic therapy using berberine as a photosensitizer, we observed a significant phototoxic effect, resulting in 19.84% viable cells in CaSki and 47.22% in HaCaT, which shows a greater effectiveness in tumor cells. From a specific colorimetric assay and absorbance spectrophotometer reading, was obtained Caspase-3 activity, which was not expressive due to the phototoxic effect caused by Photodynamic Therapy in the tumoral lineage, suggesting death by other mechanisms, such, as autophagy, necrosis and apoptosis by independent via of caspase. The results presented in this

study show that berberine is an efficient photosensitizer when associated with Photodynamic Therapy, since it was able to promote significant decrease in cell viability in cervical cancer cells.

**Keywords**: natural compound; photosensitizer; irradiation; phototoxicity; gynecological cancer.

# Lista de figuras

| Figura 1  | Estrutura molecular da berberina                                     | 19 |
|-----------|--|----|
| Figura 2  | Processo da Terapia Fotodinâmica                                     | 22 |
| Figura 3  | Esquema de redução do MTT em células viáveis                         | 26 |
| Figura 4  | Princípio do Kit de ensaio colorimétrico caspase-3                   | 29 |
| Figura 5  | Efeito da berberina na viabilidade celular de células CaSki avaliado |    |
|           | pelo ensaio de MTT   | 31 |
| Figura 6  | Efeito da berberina na viabilidade celular de células HaCaT avaliado |    |
|           | pelo ensaio de MTT   | 32 |
| Figura 7  | Imagens de microscopia de fluorescência de células CaSki             |    |
|           | incubadas com berberina  | 33 |
| Figura 8  | Imagens de microscopia de fluorescência de células HaCaT             |    |
|           | incubadas com berberina  | 34 |
| Figura 9  | Viabilidade celular de células CaSki (A) e HaCaT (B) submetidas à    |    |
|           | diferentes tratamentos.  | 35 |
| Figura 10 | Efeito da terapia fotodinâmica sobre as células CaSki e HaCaT        | 35 |
| Figura 11 | Efeito da terapia fotodinâmica sobre as células CaSki no ensaio de   |    |
|           | cinética   | 36 |
| Figura 12 | Efeito da terapia fotodinâmica sobre as células HaCaT no ensaio de   |    |
|           | cinética   | 37 |
| Figura 13 | Indução de apoptose através da regulação de caspase-3 na             |    |
|           | linhagem CaSki   | 38 |
| Figura 14 | Indução de apoptose através da regulação de caspase-3 na             |    |
|           | linhagem HaCaT   | 38 |

| BBR               | Berberina   |
|-------------------|---|
| °C                | Celcius   |
| CO <sub>2</sub>   | Dióxido de carbono  |
| DEVD-PNa          | Aspartil-glutamil-valil-aspartil-p-nitroanilida             |
| DNA               | Ácido Desoxirribonucleico                                   |
| DMEM              | Meio essencial mínimo modificado Dulbeco                    |
| DMSO              | Dimetilsulfóxido  |
| DTT               | Ditiotreitol  |
| FBS               | Soro fetal bovino   |
| HPV               | Humano Papilomavírus  |
| J/cm <sup>2</sup> | Joules por centímetro quadrado                              |
| Kg                | Quilo   |
| М                 | Molar   |
| mg                | Miligrama   |
| mL                | Mililitro   |
| mМ                | Milimolar   |
| MTT               | (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difeniltetrazol bromídio)     |
| mW                | Miliwatt  |
| nm                | nanômetro   |
| PBS               | Tampão fosfato  |
| PS                | Sigla em inglês para photosensitizers - fotossensibilizador |
| ROS               | Espécies reativas de oxigênio                               |
| rpm               | Rotação por minuto  |
| TFD               | Terapia Fotodinâmica  |
| U/mL              | Unidade por mililitro                                       |
| UV                | Radiação ultravioleta                                       |
| UVA               | Radiação ultravioleta A                                     |
| UVB               | Radiação ultravioleta B                                     |
| μL                | Microlitro  |
| μM                | Micromolar  |
| μm                | Micrometro  |
|                   |   |

# Lista de siglas

| 1. INTRODUÇÃO                                     | 15 |
|---|----|
| 2. REVISÃO DE LITERATURA                          | 17 |
| 2.1. Câncer de colo do útero                      | 17 |
| 2.2. Berberina (BBR)                              | 18 |
| 2.3. Terapia fotodinâmica (TFD)                   | 21 |
| 3. OBJETIVOS                                      | 24 |
| 3.1. Objetivo geral                               | 24 |
| 3.2. Objetivos específicos:                       | 24 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS                            | 25 |
| 4.1. Preparo da Berberina                         | 25 |
| 4.2. Cultivo celular                              | 25 |
| 4.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT)          | 26 |
| 4.4. Ensaio de captação intracelular da berberina | 27 |
| 4.5. Ensaio de fototoxicidade                     | 28 |
| 4.6. Ensaio de atividade de caspase 3             | 29 |
| 4.7. Análise estatística                          | 30 |
| 5.RESULTADOS                                      | 31 |
| 5.1. Ensaio de viabilidade celular (MTT)          | 31 |
| 5.2. Ensaio de captação intracelular da berberina | 32 |
| 5.3. Ensaio de fototoxicidade                     | 34 |
| 5.4. Cinética                                     | 36 |
| 6. DISCUSSÃO                                      | 39 |
| 7. CONCLUSÃO                                      | 45 |
| REFERÊNCIAS                                       | 46 |

# Sumário

# 1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é o sétimo tipo de câncer mais incidente no mundo (FERLAY et al., 2015), sendo os países menos desenvolvidos responsáveis por 84% dos casos de câncer de colo de útero (KESSLER., 2017). No Brasil, excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de colo uterino é o primeiro mais incidente na Região Norte. Nas Regiões Nordeste e Centro-Oeste ocupa a segunda posição mais frequente e nas Regiões Sul e Sudeste está na quarta posição (INCA, 2017).

Infecções persistentes com Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco, principalmente HPV 16 e HPV 18 (SO et al., 2016), seguidas por transformação maligna resulta em câncer de colo de útero em 95 % dos casos (KUMAR et al., 2018). A formação da neoplasia pode sofrer influências de outros fatores de risco, como: idade, genética, nutrição e meio ambiente (FONTENOT, 2015).

Atualmente, os principais tratamentos clínicos para câncer são a cirurgia, histerectomia radical, nos casos de câncer de colo de útero precoce (CIBULA et al., 2011), a quimioterapia para neoplasias colo uterinas metastáticas e recorrentes (PORTILHO et al.,2013) e também a radioterapia (LOMAX et al., 2013). As duas últimas, tendem a ter baixa seletividade para as células tumorais, e para serem eficazes precisam ser administradas em altas doses tóxicas, induzindo assim efeitos colaterais indesejáveis (SANCHEZ-MORENO et al., 2018). Além disso, a maioria destes tratamentos tem como barreira a heterogeneidade do tumor, a toxicidade sistêmica e a resistência aos medicamentos (EDIRIWICKREMA et al, 2015).

O processo tumoral é complexo e depende da transformação de diversas vias de sinalização da célula. Durante a tumorigênese as células cancerígenas passam por alterações genéticas e epigenéticas, as quais dão origem a uma heterogeneidade funcional, com implicações significativas para a terapia do câncer (AGNARELLI et al., 2018). Diante disto, o uso de fitoquímicos que atuam em diferentes alvos moleculares e vias de sinalização é uma abordagem interessante na terapia do câncer (GEORGAKILAS et al., 2016). Neste contexto, a berberina é um composto natural com ação multidirecional e que apresenta várias propriedades farmacológicas, como analgésico (TANG et al., 2013), anti-inflamatório (MO et al., 2014), antidiabético (HSU et al., 2013), cardioprotetor (DEROSA et al., 2012) e

antidepressivo (BHUTADA et al., 2011), inclusive antitumorais (CASEY et al., 2015; LIU et al., 2016; MOHAMMADZADEH et al., 2017). Este fitoquímico e seus análogos mostraram possuir propriedades anticancerígenas em células de câncer de colo de útero (CaSki) (LIN et al., 2007; MISTRY et al.,2016; MISTRY et al.,2017a; MISTRY et al.,2017b). Além disso, já foi demonstrado o potencial da berberina como fotossenssibilizador na terapia fotodinâmica (ANDREAZZA et al., 2016).

A Terapia Fotodinâmica é um tipo de tratamento que depende de três agentes terapêuticos, um composto químico fotossensibilizante, a luz e o oxigênio molecular. Apresenta-se como uma terapêutica atraente para doença pré-invasiva e câncer invasivo de colo de útero, por provocar a morte seletiva do tumor (GADZINSKI *et al.*, 2017). É minimamente invasiva, o que diminui a taxa de morbidade, preserva a integridade anatômica e funcional de muitas células (OLIVO et al., 2010), e pode ser um método alternativo no auxílio da eliminação seletiva de células e tecidos cancerígenos, evitando efeitos colaterais indesejados e toxicidade sistêmica quando comparado as terapias convencionais (KRUGER et al., 2018). A fototoxicidade deste método terapêutico em relação às linhagens celulares normais foi examinada utilizando a linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizados (HaCaT), a qual é utilizada como controle, com sucesso, em diversos estudos relacionados com o câncer de colo de útero (KWON et al., 2016; YIN et al., 2017; ZACAPALA-GÓMEZ et al., 2018).

Uma vez que já foi relatado, de forma isolada, o potencial antitumoral e de agente fotossensibilizante da berberina, o objetivo do nosso estudo foi unir essas duas características, associando este composto à terapia fotodinâmica, e a partir daí investigar a efetividade antineoplásica desta associação sobre as células de carcinoma cervical.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Câncer de colo do útero

O câncer do colo do útero é o quarto câncer mais frequente em mulheres no mundo, representando 6,6% dos cânceres femininos, e a quarta principal causa de morte com estimativa de 570.000 novos casos e 311.000 mortes em 2018. Considerando as regiões com baixo índice de desenvolvimento humano, a taxa de incidência e mortalidade ocupa o segundo lugar no mundo. Esta doença é a principal causa de morte por câncer em 42 países, a maior parte deles está localizada na África Subsaariana e no Sudeste Asiático (FERLAY et al., 2018). No Brasil, ocupa a terceira posição e há a estimativa de 16.370 novos casos para cada ano do biênio 2018-2019, apresentando um risco de aproximadamente 15,43 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2017).

O principal fator relacionado com a etiologia do câncer cervical são as infecções pelo HPV, sendo o HPV16 e HPV18 os tipos mais comuns desse vírus que estão diretamente relacionados ao surgimento da doença (WHO, 2014). Porém, para que a neoplasia se desenvolva é preciso também a presença de alterações genéticas e epigenéticas (SAAVEDRA et al., 2012). Além disso, outros fatores podem estar associados ao desenvolvimento desta doença, como a iniciação precoce da atividade sexual, a qual aumenta a chance de infecção pelo HPV (WHO, 2014), a multiparidade, o uso por muito tempo de contraceptivos orais estrogênicos, a imunossupressão e o tabagismo (KUMAR et al., 2018).

A Organização Mundial da Saúde reconhece três categorias de tumores epiteliais de colo uterino: carcinoma de células escamosas - responsável por aproximadamente 80% dos cânceres de colo de útero, adenocarcinoma - que corresponde em torno de 15%, e outros tumores epiteliais, nos quais estão inclusos tumores neuroendócrinos e carcinoma indiferenciado (MARTH et al., 2017). O carcinoma cervical de células escamosas é um câncer invasivo epitelial que afeta as células escamosas que cobrem a ectocérvix, enquanto os adenocarcinomas se originam principalmente de lesões precursoras de glândulas endocervicais (NICOLÁS-PÁRRAGA et al., 2017).

O tratamento de câncer do colo do útero padrão para pacientes em estágio inicial é a cirurgia (KUMAR et al., 2018). Para o câncer localmente avançado usa-se a radioterapia (LEE et al., 2016), a qual promove altas taxas de cura, porém existe uma grande preocupação com os efeitos da toxicidade a longo prazo. Devido à proximidade anatômica do intestino e da bexiga ao colo do útero altas doses de radiação aplicada ao colo uterino podem gerar toxicidade e provocar o desenvolvimento de enterite, cistite, fístula e estenose (RUBINSAK et al, 2018). No caso de câncer metastático, persistentes e recorrentes a quimioterapia é utilizada como terapêutica, porém também possui efeitos adversos graves, como trombocitopenia, neutropenia, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, anemia, toxicidade hematológica e depressão da medula óssea (DAS et al., 2014). Nesse contexto, produtos naturais com perfis multiespectro têm sido demonstrados como agentes promissores para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer (FANG et al., 2017). E entre eles está a berberina um composto multidirecionador, que apresentar baixa citotoxicidade, e desta forma pode diminuir os efeitos nocivos provocados pelas terapias tradicionais (CASEY et al., 2015).

### 2.2. Berberina (BBR)

A Berberina (BBR) (cloreto de 2,3-metilenodioxi-9,10-dimetoxiprotoberberina), representada pela figura 2, é um alcalóide de isoquinolina, geralmente extraído de rizomas e raízes de espécies de plantas como *Berbis, Coptis e Hydrastis* (ARAYNE et al., 2007). Na medicina ayurvédica e chinesa é tradicionalmente utilizada como antimicrobiano, antiflamatório e antiprotozoário (VUDDANDA et al., 2010). A BBR é uma molécula fluorescente, excitada em comprimentos de onda entre 510 e 544 nm, e sua absorção e distribuição nas células podem ser estudadas por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (LIU et al., 2015; AGNARELLI et al., 2018).



Figura 1: Estrutura molecular da berberina. Fonte: PubChem. CID: 2353

Atualmente, as propriedades farmacológicas e bioativas da BBR têm sido bastante estudadas tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*, testando sua potência terapêutica sobre diversas doenças, como isquemia (MALEKI et al., 2018), diabetes (MA et al., 2018), arritmias (CHEN et al., 2018), doença de Parkinson (RIBAUDO et al., 2018) e doença de Alzheimer (HUSSIEN et al., 2018). Vários estudos tem demonstrado que a BBR tem efeito antiproliferativo e citotóxico em diferentes modelos de células tumorais, incluindo células de câncer de mama (JEONG et al., 2018), câncer de pulmão em camundongos (KABARY et al., 2018), linhagem celular HCT116 de câncer colorretal (LÜ et al., 2018), células de mieloma múltiplo (YIN et al., 2018), células de câncer endometrial (WANG et al., 2018). Além disso, a BBR mostrou possuir propriedades anticancerígenas no tratamento *in vitro* de carcinoma cervical, células CaSki, uma vez que aumentou a atividade apoptótica, e consequentemente provocou a diminuição da porcentagem de células viáveis de maneira dose e tempo dependentes (LIN et al., 2007).

Os seus efeitos anticancerígenos podem ocorrer nas fases de proliferação, crescimento e metástase da neoplasia (LIU et al, 2016). Dependendo do tipo celular a BBR pode afetar diferentes alvos moleculares (CASEY et al., 2015). Ela pode atuar interferindo na função mitocondrial e assim, desencadear a liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol provocando a ativação de caspases. Além disso, a BBR pode ativar vias não apoptóticas de morte celular (GALI-MUHTASIB et al., 2015) e também já foi relatada a indução de senescência, parada do ciclo celular

devido ao encurtamento dos telômeros, pela berberina (LIU et al., 2015). Adicionalmente, ela foi capaz de inibir as vias de sinalização de migração e invasão celular, processos essenciais na formação da metástase (TANG et al., 2015).

Estudos recentes indicam sua capacidade de modular padrões epigenéticos (WANG et al., 2016), 'cujas alterações podem ser importantes na formação e propagação tumoral (PACAUD et al., 2014). PARK e colaboradores (2014), por análise fluorespectrofotométrica conseguiu mensurar o nível de espécies reativas de oxigênio intracelular e observaram que a berberina foi capaz de produzir espécies reativas de oxigênio. Além disso, outro estudo mostrou a capacidade da berberina em inibir a invasão de células de câncer cervical e reverter a transição epitéliomesenquimal, a qual é primordial no processo de metástase do câncer, sugerindo a atuação da BBR na redução da metástase e angiogênese de células de câncer de colo de útero, constituindo desta forma uma terapia adjuvante no controle metastático (CHU et al., 2014).

Foi demonstrado que a berberina é seletivamente acumulada pelas mitocôndrias, e isso resulta em fragmentação e despolarização mitocondrial, estresse oxidativo, diminuição nos níveis de ATP e parada da proliferação celular (PEREIRA et al., 2007; SERAFIM et al., 2008). As células tumorais possuem sobrecarga de mitocôndrias, o que as tornam mais sensíveis aos compostos inibidores mitocondriais, como a BBR (YAN et al., 2017; PHATANIA et al., 2009; ZONG et al., 2016). Devido à sua carga positiva, este composto é seletivamente acumulado pelas células cancerígenas, as quais em grande parte apresentam um potencial de membrana aumentado (negativo na parte interna) (DIOGO et al., 2011). Em função da sua atuação a nível mitocondrial, a BBR é um agente com potencial fotossessibilizador para terapia fotodinâmica, a qual tem como um dos seus alvos mais importantes as mitocôndrias (ANDREAZZA et al., 2016).

Sendo assim, a associação entre berberina e terapia fotodinâmica pode ser favorável na indução de efeitos antitumorais com baixos níveis de toxicidade na linhagem de carcinoma cervical (CaSki), uma vez que já foi demonstrado, em estudos isolados, seu papel antitumoral sobre as células de câncer de colo de útero (CASEY et al., 2015) e também o seu potencial fotossensibilizante na terapia fotodinâmica, em células de glioblastoma humano primário U87-MG (ANDREAZZA et al., 2016).

## 2.3. Terapia fotodinâmica (TFD)

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma reação fotoquímica e fotofísica que depende de três fatores: um composto fotossensibilizador (PS: da sigla em inglês para photosensitizers), a luz e oxigênio molecular (KRUGER et al., 2018). O processo começa com a administração do composto fotossensibilizante, o qual é absorvido pelas células ou tecidos e então é ativado pela exposição a um comprimento de onda específico de luz (HONG et al., 2016). O PS absorve energia e passa do estado fundamental, singlet para o singlet excitado (MOKWENA et al., 2018) e em seguida para o estado de *triplet* excitado. Este último promove uma reação fotoquímica a partir de duas vias distintas (HODGKINSON et al., 2017). Na TFD do tipo I há um processo de transferência de elétron ou hidrogênio que permite o PS triplet ativado reagir de forma direta com o componente biológico formando radicais livres (NAIDOO et al., 2018), os quais podem interagir com o oxigênio triplet acarretando na formação de ânions superóxidos, radicais hidroxila e espécies reativas de oxigênio (ROS). Já no tipo II o oxigênio triplet é convertido em oxigênio singlet citotóxico, por transferência de energia (Figura 1). As duas vias podem ocorrer de forma simultânea, porém, acredita-se que os fotossenssibilizadores de forma geral favorecem a TFD do tipo II, uma vez que a geração de espécies reativas de oxigênio é muito mais simples por esta via do que pela do tipo I (ABRAHAMSE et al., 2016).



**Figura 2** :Processo da Terapia Fotodinâmica. O PS absorve energia e passa do estado fundamental *singlet* para um estado de *singlet* excitado. Este último, devido a uma perda de energia, passa para o estado *triplet* excitado. A partir daí ele pode interagir com o oxigênio molecular formando espécies reativas de oxigênio (ROS) (*Type 1*) ou com o oxigênio molecular formando oxigênio *singlet* (*Type 2*). **Fonte** : Front Microbiol. 2012 ; 3 : 120.

A TFD possui caráter curativo e paliativo (PARK et al., 2016), e é utilizada em condições não cancerosas, como antiflamatório, antifúngico, antibacteriano (HU, 2014). Além disso, já foram descritos em estudos o uso da TFD para tratar diversos tipos de câncer, entre os quais estão: o do trato digestivo (NANASHIMA et al., 2015), o melanoma metastático (NAIDOO et al., 2018), o mesotelioma pleural pulmonar e maligno (SIMONE et al., 2014), lesões de cabeça e pescoço (GREEN et al., 2013), colorretal (HODGKINSON et al., 2017) e do colo de útero (GADZINSKI *et al.*, 2017). No que se refere a este órgão ela é utilizada para tratar não só neoplasias, mas também lesões pré-malignas (ZHANG et al., 2018). Além disso, também atua em fatores etiológicos do câncer do colo uterino, como o HPV, e permite a conservação de órgãos e a preservação das funções reprodutivas da mulher (TRUSHINA et al., 2008).

A TFD atua de maneira segura e eficaz na erradicação seletiva de célulasalvo/tecidos, como células cancerígenas, evitando toxicidade sistêmica e efeitos adversos em tecidos saudáveis, por isso, é mais vantajosa em relação à quimioterapia tradicional e à radioterapia (HONG et al., 2016). A ação deste tipo de terapia pode provocar a morte celular por meio da apoptose, da necrose e da autofagia. A via ativada após o tratamento vai depender do fotossenssibilizador, da sua dose e localização subcelular e também do tipo de célula (SORIANO et al., 2017). Devido ao fato do PS poder ser direcionado para a célula alvo, através de nanopartículas ligadas à moléculas específicas de direcionamento ativo (biomoléculas ou ligantes) como anticorpos, peptídeos ou aptâmeros (KRUGER et al., 2018) ou sendo aplicado diretamente sobre o tumor, e a luz poder ser direcionada diretamente na área a ser tratada (DAI et al., 2009), esta terapia é caracterizada como sendo duplamente seletiva.

Além disso, possui exclusivos mecanismos de ação: (1) reverter quimiorresistência e sensibilizar tumores para inibidores moleculares (CHANG et al., 2008; CARTER et al., 2014; HUANG et al., 2014); (2) modular a permeabilidade vascular para uma entrega aumentada de fármaco e / ou para induzir a oclusão vascular a privar tumores de nutrientes (ZHENG et al., 2009; SENNINO et al., 2013); (3) estimular a imunidade antitumoral (SPRING et al., 2015). Diante do exposto acima, a TFD se mostra como uma terapêutica promissora no combate ao câncer.

## 3. OBJETIVOS

## 3.1. Objetivo geral

O presente estudo tem por objetivo avaliar a viabilidade do uso da berberina, como fotossensibilizador, na terapia fotodinâmica e o efeito desta associação sobre as células neoplásicas cervicais humanas da linhagem CaSki.

### 3.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a citotoxicidade da berberina na linhagem tumoral, CaSki, a partir de ensaio colorimétrico da atividade metabólica mitocondrial e espectrofotometria ;

- Utilizar como controle comparativo a linhagem celular não tumoral, HaCaT;

- Determinar a captação intracelular de berberina nas linhagens CaSki e HaCaT utilizando microscopia de fluorescência;

-Observar se a Terapia Fotodinâmica associada à berberina como fotossensibilizador induz fototoxicidade nas linhagens CaSki e HaCaT;

-Verificar o potencial antitumoral da berberina associada à terapia fotodinâmica nas células tumorais CaSki e sua efetividade quando comparada com a linhagem não tumoral HaCaT;

-Determinar quantitativamente, nas linhagens CaSki e HaCaT, tratadas com berberina e submetidas a Terapia Fotodinâmica, sinais intracelulares de ativação da apoptose a partir dos níveis de caspase efetora de apoptose (caspase 3).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1. Preparo da Berberina

O Cloreto de Berberina (Sigma-Aldrich, ST. Louis, EUA) foi diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich, ST. Louis, EUA), e desta forma, obteve-se uma solução amarela com concentração final de 50 mM. Após a diluição, o volume total foi aliquotado em microtubos, os quais foram armazenados a -20 °C.

#### 4.2. Cultivo celular

Para este estudo, foram cultivadas duas linhagens celulares: uma linhagem de carcinoma cervical infectada com HPV16 (CaSki) (Doação da Dr<sup>a</sup>. Luisa Lina Villa, USP, a qual obteve as células da ATCC), e a linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) (Doação da Dr<sup>a</sup>. Luisa Lina Villa, USP, a qual obteve as células da ATCC). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo modificado Dulbeco (DMEM) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 100 U/mL de penicilina (GIBCO, Life Technologies, Corslab,Califórnia, EUA) e 10 % (v/v) de soro fetal bovino (FBS) inativado (Cultilab, Campinas, SP, Brasil).

O cultivo foi realizado em garrafa de poliestireno, de área de crescimento de 75 cm<sup>2</sup>, com dispositivo de aeração contendo filtro acoplado à tampa (Kasvi, TPP, FL, USA). A incubação se deu em estufa enriquecida de CO<sub>2</sub> (5%) à temperatura de 37 °C. As células foram repicadas segundo a necessidade e utilizadas nos experimentos até atingirem no máximo vinte passagens depois de descongeladas. Para a linhagem CaSki o repique se deu quando a confluência estava, no máximo, em torno dos 80 %, enquanto que para a HaCaT a porcentagem limite foi de cerca de 70 %. O processo para repicar as células foi realizado no fluxo laminar e ocorreu da seguinte forma: o meio contido dentro da garrafa foi descartado. Depois, lavou-se o recipiente com tampão fosfato (PBS), o qual também foi despejado no descarte. Após isto, foram adicionados 2 mL de tripsina (GIBCO, Life Technologies, Corslab,Califórnia, EUA) na garrafa, a qual foi incubada na estufa em condições descritas anteriormente. Enquanto a linhagem tumoral ficou de 4 a 5 minutos

incubada com tripsina, a linhagem de queratinócitos ficou de 6 a 7 minutos. A tripsinização tem como objetivo desprender as células aderidas na garrafa.

Posteriormente, observou-se no microscópio de luz invertida o total desprendimento das células, e então, a garrafa foi levada ao fluxo e o volume de trabalho de 10 mL foi completado com DMEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com substâncias já descritas anteriormente. O conteúdo foi ressuspendido, para desfazer possíveis aglomerados celulares e homogeneizá-lo. Por seguinte, parte da solução foi descartada e o volume total foi complementado com meio de cultura novo. Por fim, anotou-se na garrafa mais uma passagem e levou-a até a estufa para incubação. Vale ressaltar que antes de realizar o repique o fluxo laminar foi esterilizado com álcool 70 % e 20 minutos de radiação ultravioleta (UV), diminuindo assim, o risco de contaminação, e as linhagens foram repicadas separadamente para evitar o cruzamento entre as linhagens.

## 4.3. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

O ensaio de MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difeniltetrazol bromídio) mede a toxicidade do composto para o metabolismo celular de glicídios, através da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade celular tem uma relação diretamente proporcional com a atividade mitocondrial e é quantificada a partir dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT (Figura 3).



Cristal de formazan (violeta)

**Figura 3**. Esquema de redução do MTT em células viáveis. O tretázólio pela atuação de enzimas mitocondriais é reduzido à cristais de formazan. **Fonte:** Cad. da Esc. de Saúde, Curitiba, V.1, n.15, p. 42-51.

Este experimento foi realizado em triplicata e em três ensaios independentes e teve como objetivo determinar a citotoxicidade da BBR nas linhagens celulares CaSki e HaCaT. Para a realização deste, 1 x  $10^4$  células destas linhagens foram plaqueadas por poço, em placas de 96 poços (Kasvi, TPP, FL, USA), e incubadas na estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas. Em seguida, as células de ambas linhagens foram incubadas com diferentes concentrações de BBR (1; 25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160 e 320 µM) durante 24 e 48 horas.

Passado os devidos tempos, o meio contendo BBR foi aspirado e a cada poço, contendo as linhagens CaSki e HaCaT aderidas, adicionou-se 100 µL de solução de MTT na concentração de 1 mg/mL de meio (DMEM). Feito isto, a placa foi incubada por 30 minutos a 37 °C. Após este período, a solução foi aspirada e adicionou-se 100 µL de DMSO em cada poço, com o objetivo de solubilizar os cristais de formazan.

Em seguida, realizou-se a leitura da placa através do espectrofotômetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germânia). A placa foi inserida no aparelho e agitada por 5 minutos a 200 rpm. E por fim, foi realizada a leitura da placa em comprimento de onda de 570 nm. Os dados das absorbâncias obtidos foram explanados em uma tabela gerada pelo programa Microsoft Excel®. Por fim, nesta mesma tabela foi calculada a média aritmética simples (valor amostral) das três absorbâncias geradas para cada concentração e a porcentagem da viabilidade celular a partir da fórmula:

% Viabilidade celular = (Valor amostral/ Média do controle) x 100 %

## 4.4. Ensaio de captação intracelular da berberina

A berberina é excitada em comprimentos de onda que variam de 510 a 544 nm (ANDREAZZA et al., 2016). Para análise de captação intracelular da berberina, foram utilizadas placas de seis poços e plaqueadas  $30 \times 10^4$  células em cada um, e incubadas por 24 horas na estufa a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram incubadas com 2,5 µM de berberina, concentração escolhida a partir dos resultados obtidos no ensaio de MTT, na estufa, nas mesmas condições descritas acima, durante diferentes tempos (1, 3, 6, 24 e 48 horas).

Após os respectivos períodos, as células foram lavadas duas vezes com PBS, para tirar qualquer resíduo de berberina que não tenha sido absorvido pelas células, e foi colocado o tampão fosfato para visualizá-las no microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axio Vert. A1) com canal para isotiocianato de fluoresceína (FITC) (espectro de excitação do blue laser, 550 nm, FITC/GFP). A partir do software Zen<sup>®</sup> 2012 foi possível tirar fotos e observar como se deu a captação da berberina em ambas linhagens e nos diferentes tempos de incubação com o composto.

### 4.5. Ensaio de fototoxicidade

Este experimento foi realizado em triplicata e em três ensaios independentes e teve como objetivo avaliar os efeitos da TFD sobre as linhagens celulares CaSki e HaCaT e em seguida determinar se as diminuições na viabilidade celular foram ocasionadas pelo dano fotooxidativo. As células foram tripsinizadas e plaqueadas na densidade de 1,5 x 10<sup>4</sup> células por poço, em placas de 96 poços, durante 24 horas, tempo definido a partir do ensaio de captação intracelular da berberina. Foram definidos quatro grupos de tratamento para a realização do ensaio: Grupo 1 (controle- sem tratamento); Grupo 2 (Laser- irradiado); Grupo 3 (BBR- incubado 24 horas com berberina); Grupo 4 (BBR + laser- incubado 24 horas com berberina e irradiado). A concentração de berberina utilizada para incubação foi de 2,5 µM.

Após os devidos tratamentos, foi retirado o meio de todos os poços, dos grupos tratados e não tratados com berberina, e as células passaram por uma lavagem com PBS. Feito isso, foi adicionado 100 µL de meio DMEM sem fenol (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) a cada poço. Em seguida, os poços do grupo 2 e do grupo 4 foram submetidos à irradiação, do sistema laser vet light (Quantum Tech, São Carlos, Brasil), de potência e 80 J/cm<sup>2</sup> de energia, durante 4 minutos.

Quando terminou o processo de irradiação, o meio de todos os poços foi removido e 100 µL de um novo meio (DMEM sem fenol + 10 % de FBS) foi adicionado a cada poço. A placa foi incubada por 24 horas e logo após o período foi realizado o ensaio de viabilidade celular (MTT). Os valores obtidos foram normalizados com o controle, ou seja, células submetidas às mesmas condições experimentais, porém, sem a adição da berberina e irradiação. Os resultados foram expressos percentualmente e de acordo com a viabilidade celular, como foi descrito no item 4.3.

## 4.6. Ensaio de atividade de caspase 3

Para fazer este experimento, juntamente com o ensaio de fototoxicidade e seguindo os mesmos passos e condições, foi realizado um ensaio de cinética, no qual foi calculado a viabilidade celular, após 30 min, 1 hora, 2 horas e 3 horas da irradiação, com o objetivo de encontrar uma viabilidade em torno de 50% para as duas linhagens (HaCaT e CaSki). Na realização do ensaio utilizou-se o kit Caspase 3 Assay (colorimétrico) (Abcam, Cambridge, Reino Unido). O kit contém: solução tamponante de lise celular, 2x solução de reação, substrato DEVD-Pna (4 mM), DTT (1 M), solução tamponante de diluição.

O ensaio de caspase-3 baseia-se em um peptídeo curto (reagente-pNa) que contém sequências de clivagem específicas reconhecidas pela caspase (Figura 4). Como resultado, a caspase-3 cliva o reagente e libera a sonda de detecção colorimétrica. O pNA (p-nitroanilida) foi quantificado a partir de espectrofotometria.



**Figura 4.** Princípio do Kit de ensaio colorimétrico caspase-3. A caspase-3 cliva o peptídeo (reagentepNA), e desta forma libera o cromóforo pNA, o qual é quantificado por espectrofotometria. **Fonte:** https://bqckit.com/wp-content/uploads/2017/06/esquema-cromoforo.png.

Para cada linhagem foram plaqueadas 40 x 10<sup>4</sup> células por poço e as placas foram incubadas por 24 horas. Para este experimento foram feitos três grupos: grupo 1 (controle- sem tratamento); grupo 2 (BBR- incubado 24 horas com a berberina); Grupo 3 (BBR + Laser- incubado 24 horas com a berberina e irradiado). Cada grupo passou pelo seu devido tratamento e após 1 hora da irradiação do grupo 3, retirou-se o meio de todos os poços, ao quais foram lavados com PBS e logo tripsinizados. Depois, as células do grupo 1, 2 e 3 foram colocadas em tubos devidamente nomeados e centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos, em temperatura de 25 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os tubos com os *pellets* foram colocados no gelo.

Para utilização, as soluções tamponante de lise celular, 2x solução de reação e solução de diluição foram mantidas a temperatura ambiente. O substrato DEVDpNA (substrato colorimétrico da caspase-3) e o DTT foram aliquotados em microtubos. Inicialmente foi adicionado 50 µL da solução tamponante de lise celular a cada tubo com o *pellet.* O conteúdo foi ressuspendido, transferido para microtubos devidamente nomeados e reservado por 10 minutos para deixar o reagente agir. Passado o tempo as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minutos, a 25 °C. Após isso, o sobrenadante de todos os microtubos foram reservados para quantificação de proteínas, no espectrofotômetro NanoDrop<sup>™</sup> 1000 (Thermo Scientific).

Depois de quantificadas, o número de proteínas das amostras do grupo 1, 2 e 3 foi normalizado utilizando a solução tamponante de diluição. O mix contendo 25 µL de amostra, a solução tamponante de reação (25 µL por reação), DTT (0,25 µL por reação) e substrato DEVD-pNA (2,5 µL por reação) foi preparado e distribuído em placa de 96 poços. A placa foi incubada por 2 horas em estufa à 37 °C. Após incubação, foi levada para leitura no espectrofotômetro FLUOstar Omega (BMG Labtech).

## 4.7. Análise estatística

A partir de valores de absorbância, foram efetuadas avaliações quantitativas para diferentes ensaios. A análise exploratória dos dados foi realizada em planilhas e gráficos gerados pelo *software GraphPad Prism versão 5.01 (*Software Inc., 1992-2007). Para comprovação de significância de alguns resultados foi utilizado o teste ANOVA- Análise de variância de fator único, por meio do teste de Tukey para comparações múltiplas e também o teste T pareado. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p \le 0.05$ ).

## 5. RESULTADOS

## 5.1. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o objetivo de selecionar uma concentração de berberina, para a qual as linhagens CaSki e HaCaT apresentassem uma viabilidade celular maior que 80% sem a terapia fotodinâmica, valor ideal para a realização dos próximos experimentos. A partir dos resultados, representados pelas figuras 4 e 5, foi observado que a viabilidade celular mostrou um efeito dose dependente em 24 e 48 horas, para ambas linhagens. O valor da viabilidade celular foi inversamente proporcional ao tempo de exposição ao composto, ocorrendo uma única exceção com a linhagem tumoral na concentração de 0,625 µM, na qual esta relação foi diretamente proporcional. Além disso, observou-se em concentrações menores (0,625-10 µM) uma maior sensibilidade à berberina na linhagem CaSki do que na HaCaT, já em concentrações maiores (20-320 µM) ocorreu o contrário. Diante dos dados obtidos, foi definida a concentração de 2,5 µM para a realização dos ensaios posteriores, para a linhagem tumoral e de queratinócitos, pois essa dose apresentou uma viabilidade de 92,07 % para as células CaSki e 97,09 % para linhagem HaCaT.







**Figura 6**: Efeito da berberina na viabilidade celular de células HaCaT avaliado pelo ensaio de MTT. Células HaCaT foram incubadas com diferentes concentrações de berberina (0,625  $\mu$ M, 1,25  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M e 40  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 160  $\mu$ M e 320  $\mu$ M), e durante o período de 24 e 48 horas. Cada experimento foi realizado em triplicata e em três ensaios independentes.

### 5.2. Ensaio de captação intracelular da berberina

A BBR emite fluorescência verde-clara quando excitada pela linha de laser de 550 nm. Por meio do microscópio invertido com canal para FITC, utilizando uma concentração de 2,5 µM da BBR para as linhagens CaSki e HaCaT, foi possível capturar imagens e observar a internalização do composto nas células em diferentes tempos de incubação (1, 3, 6, 24 e 48 horas) (Figura 6). Observamos que a intensidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de BBR internalizada. A partir de uma hora de incubação já foi possível observar internalização da BBR, mas foi com 24 horas que se teve uma maior concentração do composto internalizada, apresentando assim, uma maior intensidade de fluorescência tanto para a linhagem tumoral quanto para a linhagem de queratinócitos. Esta por sua vez, teve um processo de internalização da BBR mais lento, porém a metabolizou mais rápido em relação às células neoplásicas, quando se leva em consideração o período máximo de incubação, 48 horas.

Observou-se também que a distribuição do composto para a concentração utilizada (2,5 µM) se deu principalmente no citoplasma. As células do controle, incubadas apenas com DMEM suplementado, não exibiram nenhum sinal de

fluorescência. Diante dos resultados obtidos, foi escolhido o tempo de 24 horas de incubação com a BBR para realizar os experimentos seguintes, pois foi onde observamos a maior concentração do composto no meio intracelular para ambas linhagens.



**Figura 7**: Imagens de microscopia de fluorescência de células CaSki incubadas com berberina. As fotos foram obtidas após 1, 3, 6, 24 e 48 horas de incubação com berberina, utilizando o microscópio de fluorescência invertido e o *software* Zen<sup>®</sup> 2012. O controle não foi incubado com o composto. **Aumento 40x. Escala: 20µm.** 



**Figura 8**: Imagens de microscopia de fluorescência de células HaCaT incubadas com berberina. As fotos foram obtidas após 1, 3, 6, 24 e 48 horas de incubação com berberina, utilizando o microscópio de fluorescência invertido e o *software* Zen<sup>®</sup> 2012. O controle não foi incubado com o composto. **Aumento 40x. Escala: 20µm.** 

### 5.3. Ensaio de fototoxicidade

Este ensaio avaliou a eficácia da associação entre berberina e terapia fotodinâmica. No grupo apenas incubado 24 horas com a berberina a viabilidade celular foi de 90,51 % para as células CaSki e de 80,26 % para a HaCaT (Figura 9). Já no que recebeu a incubação com a BBR, pelo mesmo tempo, e foi irradiado observamos 19,84 % de viabilidade celular para as células CaSki e 47,22 % de viabilidade celular para a linhagem HaCaT. Estes últimos resultados demonstram que o efeito da terapia foi mais significativo para a linhagem tumoral (Figura 10), e também indica que a uso da berberina como fotossenssibilizador na Terapia Fotodinâmica foi muito eficaz. Observou-se também um aumento da viabilidade celular do grupo que foi apenas irradiado em relação ao controle, de 8,59 e 7,12 % para as linhagens CaSki e HaCaT, respectivamente.



**Figura 9**: Viabilidade celular de células CaSki (A) e HaCaT (B) submetidas à diferentes tratamentos. Representação percentual da viabilidade celular do grupo controle (sem tratamento), laser (irradiado), BBR (incubado 24 horas com berberina) e BBR + Laser (incubado 24 horas com berberina e irradiado). O percentual de células viáveis foi obtido através do ensaio de MTT, após 24 horas da irradiação. Cada experimento foi realizado em triplicata e em três ensaios distintos. Para fins de comparação foi realizada análise estatística através do teste ANOVA, seguido pelo teste Tukey. (\*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001).



**Figura 10**: Efeito da terapia fotodinâmica sobre as células CaSki e HaCaT. A viabilidade celular, usada para avaliar a fototoxicidade, foi obtida através do ensaio de MTT, após 24 horas da irradiação, precedida por 24 horas de incubação com a berberina. Cada experimento foi realizado em triplicata e em três ensaios distintos. A análise estatística foi realizada através do teste T pareado (\*: *p*<0,05).

## 5.4. Cinética

O ensaio de cinética permitiu encontrar uma viabilidade celular em torno dos 50%, para as células HaCaT e CaSki submetidas a incubação de 24 horas com a berberina e irradiadas (BBR + Laser). Foi realizado o ensaio de MTT após 30 minutos, 1, 2 e 3 horas de irradiação. O grupo controle, o qual não recebeu tratamento, foi utilizado como parâmetro de comparação. A viabilidade celular da linhagem tumoral CaSki (Figura 11) foi de 49,65% em 30 minutos, 42,29% em 1 hora, 19,99% em 2 horas e 20,93% em 3 horas. Na linhagem não tumoral (figura 12) foi de 67,88% em 30 minutos, 63,53% em 1 hora, 27,89% em 2 horas e 33,29% ao final de 3 horas. A partir dos valores de viabilidade celular demonstrados acima, para a linhagem CaSki e HaCaT, foi observado que independentemente do tempo as células tumorais apresentaram uma viabilidade celular menor do que a HaCaT. Para a realização do ensaio de caspase 3 foi escolhido o tempo de 1 hora, no qual as duas linhagens apresentaram viabilidade mais próxima de 50%, concomitantemente.



**Figura 11**. Efeito da terapia fotodinâmica sobre as células CaSki no ensaio de cinética. Representação da fototoxicicidade em células CaSki .incubadas 24 horas com berberina (2,5  $\mu$ M) e irradiadas. A viabilidade celular foi calculada a partir do ensaio de MTT e utilizando o controle (sem tratamento) como parâmetro. A porcentagem de células viáveis foi obtida após 30 minutos, 1, 2 e 3 horas da fotoativação. Cada experimento foi realizado em triplicata e em três ensaios distintos.



**Figura 12.** Efeito da terapia fotodinâmica sobre as células HaCaT no ensaio de cinética. Representação da fototoxicicidade em células CaSki .incubadas 24 horas com berberina (2,5  $\mu$ M) e irradiadas. A viabilidade celular foi calculada a partir do ensaio de MTT e utilizando o controle (sem tratamento) como parâmetro. A porcentagem de células viáveis foi obtida após 30 minutos, 1, 2 e 3 horas da fotoativação. Cada experimento foi realizado em triplicata e em três ensaios distintos.

### 5.5. Ensaio de atividade da Caspase 3

A atividade de caspase 3 foi realizado 1 hora após o processo de terapia fotodinâmica, em que tínhamos uma viabilidade celular de 42,29 e 63,53% para as linhagens CaSki e HaCaT, respectivamente. Na figura 11, observamos na linhagem tumoral (figura 13) um aumento da atividade da caspase-3 de 26,31% no grupo BBR + Laser (incubado com berberina e irradiado) em relação ao controle (sem tratamento), enquanto que na linhagem não tumoral (figura 14) foi de 61,5% no grupo BBR + Laser em relação ao controle. Nas células CaSki o grupo que foi só incubado com a BBR teve um aumento de 26,31% na atividade da caspase, enquanto nas células HaCaT ocorreu uma diminuição de 55%. A linhagem não tumoral teve maior expressão de caspase-3 quando levado em consideração o grupo BBR + Laser.



**Figura 13**: İndução de apoptose através da regulação de caspase-3 na linhagem CaSki. Representação da atividade da caspase-3 nos grupos controle (sem tratamento), BBR (incubado com berberina), BBR+Laser (incubado com berberina e irradiado). As atividade catalíticas da caspase-3 foram obtidos utilizando o substrato específico DEVD-pNA e quantificados a partir de espectrofotometria. (\*: p<0,05; ns: não significante).



**Figura 14**: indução de apoptose através da regulação de caspase-3 na linhagem HaCaT. Representação da atividade da caspase-3 nos grupos controle (sem tratamento), BBR (incubado com berberina), BBR+Laser (incubado com berberina e irradiado). As atividades catalíticas da caspase-3 em lisados celulares foram avaliadas usando os substratos específicos DEVD-pNA e quantificados a partir de espectrofotometria. (\*: p<0,05; \*\*: p<0,01).

### 6. DISCUSSÃO

A associação da berberina como agente fotossensibilizante na Terapia fotodinâmica proposta por nós nesse trabalho apresentou resultados relevantes, uma vez que essa terapia promoveu morte celular de forma muito eficiente e se mostrou mais efetiva na linhagem tumoral. Isso mostrou que a berberina é um composto com efetividade promissora na TFD, e desta forma essa associação também mostra um potencial interessante como tratamento adjuvante para o carcinoma cervical infectado por HPV 16. Por possuir uma seletividade significante, preservar os órgãos e ser minimamente invasiva a terapia fotodinâmica tem sido cada vez mais aplicada na prática clínica, no tratamento de infecção cervical por HPV e carcinoma cervical (ZHANG et al., 2018), principalmente nos casos de pacientes em estágios avançados, com recidiva e tumor residual, nos quais o prognóstico ainda é muito ruim (MATSUZAKI et al., 2018).

A variabilidade nas concentrações e formulações de BBR utilizadas em estudos de ensaios *in vitro* e *in vivo*, provoca um falta de clareza em relação a este composto. Para modelos celulares (cultivo *in vitro*) o comum é uma faixa de dosagem de 0,1 nM a 300  $\mu$ M, e para animais é de 5 mg a 100 mg/Kg/dia (SERAFIM et al., 2008; ZHOU et al., 2008; DURAIRAJAN et al., 2012; BAE et al., 2013; SHIN et al., 2013).

O nosso estudo utilizou concentrações de berberina que foram de 0,625 a 320  $\mu$ M, mostrando um efeito dose e tempo dependentes na linhagem de carcinoma cervical CaSki, corroborando com um estudo de LIN e colaboradores (2007) realizado com as mesmas células, que utilizou doses de 50 a 150  $\mu$ M do composto. Em outro estudo, células HeLa de carcinoma cervical foram incubadas por 24 horas com concentrações de 20 a 100  $\mu$ M de BBR, e também se observou efeito dose dependente da BBR nestas células (RAGHAV et al., 2017). Três linhagens de células de glioblastomas (U87, U251, U118) foram incubadas por 24, 48 e 72 horas em concentração que foram de 15 a 150  $\mu$ M e todas foram sensíveis de maneira tempo e dose dependentes para o composto (LIU et al., 2015), mostrando semelhante comportamento em relação à linhagem CaSki, para o mesmo intervalo de concentração e de tempo. Embora ainda haja uma falta de clareza em relação a BBR, devido a variabilidade nas concentrações e formulações utilizadas em estudos de ensaios *in vitro* (SERAFIM et al., 2008; ZHOU et al., 2008; DURAIRAJAN et al.,

2012; BAE et al., 2013; SHIN et al., 2013), nos estudos citados, mesmo utilizando diferentes intervalos de concentração, foi observado que a berberina apresentou efeito citotóxico e atividade antiproliferativa tanto para linhagens de glioblastoma , quanto para as linhagem HeLa e CaSki, de carcinoma cervical.

Em concentrações menores (0,625-10 µM) o aumento da concentração da BBR provocou um efeito citotóxico não significante. O mesmo fenômeno se deu no ensaio realizado por CHU et al. (2014), o qual incubou células de câncer de colo de útero (CaSki, SiHa e HeLa) com doses de 5 a 20 µM e observou também uma diminuição não significante do número de células viáveis com o aumento da dose de BBR. A partir disso, supõe-se que o composto em baixas doses tem efeito citotóxico mínimo sobre as células de carcinoma cervical citadas. Já em concentrações maiores (20-320 µM) as células tumorais apresentaram maior sensibilidade à BBR, e houve um efeito citotóxico mais elevado com o aumento da concentração. Isso também foi observado em células tumorais de fígado (SMMC-7721 e HepG2) quando submetidas a maiores concentrações (50 e 100µM) de BBR (HUANG et al., 2018).

Como já foi demonstrado nos resultados, as células CaSki apresentaram maior sensibilidade à BBR do que a linhagem de queratinócitos humanos, HaCaT. A toxicicidade da BBR, em concentrações que variaram de 50 a 350 µM, também foi testada em células de câncer de cólon HCT-116, DLD1, células de carcinoma hepático HepG2 e linhagem de células hepáticas normais HL-7702, sendo esta última mais resistente à ação da BBR (LA et al., 2017). Em outro estudo (AGNARELLI et al., 2018), células de glioblastoma (U343) e células de carcinoma pancreático (MIA PaCa-2) foram mais sensíveis à BRR, em relação a células de fibroblastos dérmicos humanos (HDF), quando incubadas em concentrações de 10 e 50 µM. Como demonstrado, nossos resultados corroboram os dados de viabilidade celular obtidos em outras linhagens celulares, o que sugere uma maior sensibilidade à berberina das células tumorais em relação as não neoplásicas (ORTIZ et al., 2014; CASEY et al., 2015).

As imagens de microscopia de fluorescência mostraram que com uma concentração de 2,5 µM houve internalização da berberina a partir de 1 hora de incubação e com 48 horas ainda havia presença do composto dentro das células

para as duas linhagens analisadas, com distribuição principalmente citoplasmática e baixa intensidade de fluorescência. Isso está de acordo com um estudo, no qual está descrito que em concentrações de até 50 µM o composto provoca fluorescência pouco expressiva no citoplasma ou no núcleo, devido ao acúmulo da berberina principalmente nas mitocôndrias, enquanto em concentrações maiores que isso ambos apresentam fluorescência bem significativa, provavelmente devido à saturação do compartimento mitocondrial (SERAFIM et al., 2008). TSANG e colaboradores, em seu estudo descreveram que a exposição de células de melanoma de rato (K1735-M2) a baixas doses de BBR apresentaram pouco efeito no DNA, enquanto altas concentrações causaram desestabilização no material genético. Células de carcinoma nasofaríngeo HONE1 incubada por 2 horas com uma concentração de 12,5 µM também mostraram sinais de fluorescência citoplasmática, e em concentrações maiores (150 e 300 µM) foi detectada fluorescência no núcleo (TSANG et al., 2009).

Em estudo mais recente, concordante com os resultados já relatados, em concentração de 10 µM com incubação de 1 e 48 horas, a BBR apresentou distribuição principalmente citoplasmática em células de glioblastoma (U343), células de carcinoma pancreático (MCA PaCa-2) e de Fibroblastos dérmicos humanos (HDF), porém em altas concentrações (50 µM ou 150 µM) a fluorescência foi claramente visualizada no citoplasma e núcleo (AGNARELLI et al., 2018). A concordância destes resultados sugere que células tratadas com baixas concentrações de BBR estão mais expostas a efeitos nocivos mitocondriais, enquanto em altas doses estão sujeitas a perturbações no material genético, devido à presença do composto no núcleo, como já foi proposto anteriormente (SERAFIM et al., 2008).

A fotoativação da berberina promoveu uma fototoxicidade de 80,16 % nas células CaSki quando comparada com o controle e na HaCaT este valor foi de 52,78 %. Células de carcinoma de pulmão adulto (A549) incubadas com 5 µM de berberina e irradiadas com luz UVA (0.4 mW/cm<sup>2</sup> por 30 min) sofreram uma inibição de 53 % no crescimento em relação ao controle (BHATTACHARYYA et al., 2017). Apesar de terem sido utilizados diferentes concentrações de BBR, sistemas e tempos de irradiação distintos é possível ver a eficácia da utilização da berberina como fotossenssibilizador para células tumorais Caski e A549. Assim como no nosso

42

estudo, a irradiação não apresentou fototoxicidade sobre o grupos irradiados e a incubação com berberina não apresentou uma citotoxicicidade significante.

Fibroblastos murinos não cancerígenos (NIH-3T3) e adenocarcinoma mamário murino foram irradiados com UVA light (20 mW/cm<sup>2</sup>) imediatamente após a adição da berberina, em concentrações de 0,03 a 26,9 µM. Após 24 horas da irradiação UVA, houve aumento significativo do efeito citotóxico da berberina apenas na linhagem de adenocarcinoma mamário murino, com uma variação de citotoxicicidade entre 7,3 e 23,2%, dependente da concentração da BBR. Na linhagem de fibroblastos não houve diferença estatisticamente significante de fototoxicidade entre os grupos (irradiado e não irradiado) (JANTOVÁ et al., 2006). No nosso estudo, quando comparamos a linhagem tumoral e de queratinócitos humanos, incubadas com BBR, a fototoxicidade depois de 24 horas da irradiação é de 78,08 e 41,17%, respectivamente. Estes resultados mostram uma sensibilidade maior das células tumorais à TFD.

Os principais tipos de morte celular provocada pela TFD são apoptose, necrose e autofagia (AGOSTINIS et al., 2011). A apoptose é um processo de morte celular programada essencial para a homeostase de organismos multicelulares (MOHAMED et al., 2017), que pode ocorrer por via dependente do receptor de morte (via extrínseca) ou por via dependente de mitocôndrias (via intrínseca) (GOLDAR et al., 2015). Nesta última, em resposta a danos internos das células a proteína BAX migra para a membrana mitocondrial e inibe a ação das proteínas do linfoma 2 das células B (Bcl-2), que causam danos na membrana da mitocôndria, a qual libera citrocomo-c que ativa uma cascata de caspases e leva a morte celular (KUMAR et al., 2018). Já na via extrínseca sinais externos de receptores de morte, como Fas-L e TNF-α ativam a caspase-8, resultando em morte celular (KUMAR et al., 2018). A permeabilização da membrana mitocondrial externa e a subsequente liberação de proteínas pró-apoptóticas no espaço intermembranas das mitocôndrias são eventos chaves nas vias dependentes e independentes de caspases (LI et al., 2015). O fotossenssibilizador, sua localização intracelular, concentração, e a dose de irradiação são os fatores que vão determinar a via que será ativada (YOO et al., 2012).

Já foi descrito que as atividades anticancerígenas da BBR compreendem a indução da via mitocondrial de apoptose (CASEY et al., 2015). E isso se dá por meio da alteração do potencial de membrana mitocondrial provocado pela BBR, a qual inibe a respiração mitocondrial levando a disfunção da mitocôndria, promovendo a liberação de citocromo c e a formação de espécies reativas de oxigênio que desencadeiam a morte celular por apoptose (ORTIZ et al., 2014). A atividade antiproliferativa e de apoptose da berberina em células de carcinoma cervical tem sido atribuída ao seu acúmulo seletivo nas mitocôndrias em menores concentrações, e em doses mais altas, devido a saturação das mitocôndrias, esse acúmulo se dá no núcleo e no citoplasma com consequente alteração da síntese de DNA, perturbação do ciclo celular e promoção da apoptose (MAHATA et al., 2011). A indução de apoptose via caspase-3 na linhagem CaSki é diretamente proporcional a dose da berberina (LIN et al., 2007). Isso pode explicar a baixa taxa de expressão da caspase-3 no grupo BBR, uma vez que utilizamos uma dose de 2,5 µM do composto. Em relação às células que receberam a TFD, não observamos uma diferença significante de atividade de caspase-3 quando comparadas ao grupo tratado apenas com berberina, o que pode sugerir que a indução de apoptose pela TFD, por esta via, em células CaSki é limitada pela concentração da berberina. Além disso, sugere-se, devido a diferença significante de viabilidade celular entre esses dois grupos, que outras vias de morte celular foram ativadas.

Célula SiHa C-33 tratadas com Photogem (PGPDT) e azul de metileno (MBPDT) e irradiadas tiveram morte independente de caspases (DE FREITAS et al., 2017), concordando com estudos que associam este tipo de morte ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são responsáveis pelo mecanismo de ação da TFD (KIM et al., 2005; TAIT et al., 2008) . A TFD mediada por ácido aminolevulínico com células SiHa e HeLa, induziu a redução de RbAp48, proteína 48 associada ao retinoblastoma com papel fundamental no controle da malignização das células do colo do útero por HPV16, provocando apoptose via caspase-3 e aumento dos níveis dos oncogenes E6 e E7, devido a diminuição das proteínas supressoras de tumor p53 e retinoblastoma (Rb) (WU et al., 2017). Na associação do fotossensibilizador sulforeno com a TFD em células HeLa foram ativadas três vias apoptóticas: intrínseca (mitocondrial), extrínseca e por estresse do retículo endoplasmático (BISWAS et al., 2016). Células CaSki e ME-180 incubadas com Pc

4 (Ftalocianina 4 do Silicone) e irradiadas, morreram por apoptose, necrose em decorrência da formação de ROS (GADZINSKI et al., 2017). Os exemplos citados acima demonstram diferentes vias de morte celular que podem ser ativadas em células de câncer de colo de útero.

Na linhagem não tumoral HaCaT o grupo submetido à TFD teve um aumento significativo de caspase-3 em relação ao controle, corroborando com resultados obtidos em outros dois estudos. Em um deles, células HaCaT incubadas com desmetoxicurcumin (PS) e irradiadas com UVB, tiveram uma taxa maior de morte apoptótica em relação ao controle, devido a ativação da via TP53 (gene supressor tumoral), caspases 3 e 9 (XIN et al., 2017). No outro, queratinócitos incubados com 6-formilindolo [3,2-b] carbazol (PS) e irradiados com UVA também apresentaram uma menor viabilidade celular em relação ao controle, em decorrência de morte por apoptose, via caspase 3 (KIM et al., 2015). Ainda em relação às células HaCaT, o resultado obtido no grupo BBR, o qual apresentou uma menor atividade de caspase 3 em relação ao controle, é controverso em relação a outros estudos, nos quais células HaCaT tratadas com luteolina (SINHA et al., 2018), curcumina (MATOS et al., 2018), Óxido de aromendeno 2 (PAVITHRA et al., 2018) apresentaram maior expressão de caspase 3 em relação ao controle. Como realizamos um único evento deste ensaio, pode ser que depois da conclusão de todos os eventos os dados obtidos sejam semelhantes aos dos resultados exemplificados acima.

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no trabalho, pode-se concluir que a BBR apresentou citotoxicidade dose e tempo dependentes para as linhagens CaSki e HaCaT. Na concentração de BBR escolhida para a realização deste estudo, 2,5 µM, as células tumorais foram mais sensíveis à ação do composto, apresentando uma menor viabilidade celular quando comparada com a linhagem HaCaT. A BBR foi internalizada com eficiência pelos dois tipos celulares e se distribui majoritariamente no citoplasma. Quando associada à terapia fotodinâmica a BBR teve o seu potencial citotóxico aumentado significativamente, com uma ação mais expressiva nas células tumorais CaSki, as quais não tiveram a morte celular justificada apenas pela atividade da caspase-3, sugerindo morte celular por outras vias.

A partir dos resultados obtidos ficou evidente o potencial promissor da BBR como agente fotossensibilizante na terapia fotodinâmica aplicada ao carcinoma cervical infectado por HPV 16. Para a conclusão do nosso estudo e o esclarecimento de possíveis mecanismos de morte celular ativados a partir desta terapia, daremos prosseguimento ao ensaio de caspase-3, o qual foi realizado um único evento, assim com realizaremos o ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), para verificar se há morte celular por esta via. Em estudos futuros, pretendemos nanoencapsular a berberina e avaliar se a sua atuação e efetividade antineoplásica em células de carcinoma cervical (CaSki) quando associada à terapia fotodinâmica é melhor do que quando utilizamos a berberina não encapsulada como agente fotossensibilizador.

# REFERÊNCIAS

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemistry**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016.

AGNARELLI, A. et al. Cell-specific pattern of berberine pleiotropic effects on different human cell lines. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. **CA: A Cancer** Journal for Clinicians, v. 61, n. 4, p. 250-81, 2011.

ANDREAZZA, N. L. et al. Berberine as a photosensitizing agent for antitumoral photodynamic therapy: Insights into its association to low density lipoproteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 510, n. 1, p. 240–249, 2016.

ARAYNE, M. S.; SULTANA, N. ;BAHADUR, S. The berberis story: Berberis vulgaris in therapeutics. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 20, n. 1, p. 83–92, 2007.

BAE, J. et al. Berberine protects 6-hydroxydopamine-induced human dopaminergic neuronal cell death through the induction of heme oxygenase-1. **Molecules and Cells**, v. 35, n. 2, p. 151–157, 2013.

BHATTACHARYYA, R. et al. Differential modes of photosensitisation in cancer cells by berberine and coralyne. **Free Radical Research**, v. 51, n. 7–8, p. 723–738, 2017.

BISWAS, R. et al. Evaluation of synergistic effects of sulforaphene with photodynamic therapy in human cervical cancer cell line. Lasers in Medical Science, v. 31, n. 8, p. 1675–1682, 2016.

BHUTADA, P. et al. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. **Behavioural brain research**, v. 220, n. 1, p. 30–41, 2011.

CARTER, K.A. et al. Porphyrin-phospholipid liposomes permeabilized by nearinfrared light. Nature communications, v. 5, n. 3546, 2014.

CASEY, S. et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. **Seminars in cancer biology**, v.35 Suppl (Suppl): S199-S223,

2015.

CHANG, S.K.; RIZVI, I.; SOLBAN, N. In vivo optical molecular imaging of vascular endothelial growth factor for monitoring cancer treatment. **Clinical Cancer Researsh**, v 14, p. 4146–4153, 2008.

CHEN, X. et al. Protective effect of berberine on aconite-induced myocardial injury and the associated mechanisms. **Molecular Medicine Reports**, p. 4468–4476, 2018.

CHENG, L. L. et al. Interaction mechanism between berberine and the enzyme lysozyme. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 97, p. 209–214, 2012.

CHU, S. et al. Berberine Reverses Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Inhibits Metastasis and Tumor-Induced Angiogenesis in Human Cervical Cancer Cells. **Molecular Pharmacology**, v. 86, n. 6, p. 609-623, 2014.

CIBULA, D. et al. New classification system of radical hysterectomy: Emphasis on a three-dimensional anatomic template for parametrial resection. **Gynecologic Oncology**, v. 122, n. 2, p. 264–268, 2011.

DAI, T.; HUANG, Y.Y.; HAMBLIN, M.R. "Photodynamic therapy for localized infections--state of the art". **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 6, n.3-4, p. 170-88, 2009.

DAS, R. et al. Improved chemosensitivity in cervical cancer to cisplatin: Synergistic activity of mahanine through STAT3 inhibition. **Cancer Letters**, v. 351, n. 1, p. 81–90, 2014.

DE FREITAS, L. M. et al. Photodynamic therapy combined to cisplatin potentiates cell death responses of cervical cancer cells. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2017.

DE MATOS, R. P. et al. Effect of Curcumin-Nanoemulsion Associated with Photodynamic Therapy in Cervical Carcinoma Cell Lines. **BioMed Research** International, v. 2018, 2018.

DEROSA, G.; MAFFIOLI, P.; CICERO, A.F. Berberine on metabolic and cardiovascular risk factors: an analysis from preclinical evidences to clinical trials. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. 8, p. 1113–1124, 2012.

DIOGO, C. V. et al. Berberine as a Promising Safe Anti-Cancer Agent- Is there a Role for Mitochondria? **Current Drug Targets**, v. 12, n. 6, p. 850–859, 2011.

DURAIRAJAN, S. S. et al. Berberine ameliorates  $\beta$ -amyloid pathology, gliosis, and cognitive impairment in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 12, p. 2903–2919, 2012.

EDIRIWICKREMA, A.; SALTZMAN, W. Mark. Nanotherapy for Cancer: Targeting and Multifunctionality in the Future of Cancer Therapies. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 1, n. 2, p. 64–78, 2015.

FANG, J. et al. Systems Pharmacology-Based Discovery of Natural Products for Precision Oncology Through Targeting Cancer Mutated Genes. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 177-187, 2017.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.

FERLAY, J. et al., Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, 2018.

FONTENOT, H. B. Urine-Based HPV Testing as a Method to Screen for Cervical Cancer. **Nursing for Women's Health**, v. 19, n. 1, p. 59–65, 2015.

GADZINSKI, J. A. et al. Evaluation of Silicon Phthalocyanine 4 Photodynamic Therapy Against Human Cervical Cancer Cells In Vitro and in Mice. **Advances in biological chemistry**, v. 6, n. 6, p. 193–215, 2017.

GALI-MUHTASIB, H. et al. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: Beyond apoptosis. **Apoptosis**, v. 20, n. 12, p. 1531–1562, 2015.

GOLDAR, S. et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer

development and treatment. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 16, n. 6, p. 2129–2144, 2015.

GREEN, B.; COBB, A. R.; HOPPER, C. Photodynamic therapy in the management of lesions of the head and neck. **British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 51, n. 4, June 2013, p. 283-287, 2013.

GUAN, D. et al. Study on application of photodynamic therapy for the treatment of cervical cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 9, n. 12, p. 23337–23344, 2016.

HODGKINSON, N.; KRUGER, C. A.; ABRAHAMSE, H. Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells. **Tumor Biology**, v. 39, n. 10, p. 1–17, 2017.

HONG, E. J.; CHOI, D. G.; SHIM, M. S. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 4, p. 297–307, 2016.

HSU, Y. Y.; TSENG, Y. T.; LO, Y. C. Berberine, a natural antidiabetes drug, attenuates glucose neurotoxicity and promotes Nrf2-related neurite outgrowth. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n.3, p. 787–796, 2013.

HU, Z.; OLEINICK, N.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic Therapy as an Emerging Treatment Modality for Cancer and Non-Cancer Diseases. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. S1, n. e001, p. 1–3, 2014.

HUANG, Y. et al. Berberine, a natural plant alkaloid, synergistically sensitizes human liver cancer cells to sorafenib. **Oncology Reports**, v. 40, n. 3, p. 1525–1532, 2018.

HUANG, H.C.; HASAN, T. The 'Nano' World in Photodynamic Therapy. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 2, n. 4, 2014.

HUSSIEN, H. M. et al. Neuroprotective effect of berberine against environmental heavy metals-induced neurotoxicity and Alzheimer's-like disease in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, p. 432–444, 2018.

INCA. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil. [s.l.: s.n.], 2017. Disponível em: <a href="http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf">http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf</a>. Acesso em: 20

jun. 2018.

IQBAL, Z. et al. Phthalocyanine-Biomolecule Conjugated Photosensitizers for Targeted Photodynamic Therapy and Imaging. **Current Drug Metabolism**, v. 16, n. 9, p. 816–832, 2015.

JANTOVÁ, S. et al. Photochemical and phototoxic activity of berberine on murine fibroblast NIH-3T3 and Ehrlich ascites carcinoma cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 85, n. 3, p. 163–176, 2006.

JEONG, Y. et al. Berberine Suppresses Fibronectin Expression through Inhibition of c-Jun Phosphorylation in Breast Cancer Cells. **Journal of Breast Cancer**, v. 21, n. 1, p. 21, 2018.

KABARY, D. M. et al. Hyaluronate/lactoferrin layer-by-layer-coated lipid nanocarriers for targeted co-delivery of rapamycin and berberine to lung carcinoma. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 183–194, 2018.

KESSLER, Theresa A. Cervical Cancer: Prevention and Early Detection. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 33, n. 2, p. 172–183, 2017.

KIM, H. S.;LEE, M. Essential role of STAT1 in caspase-independent cell death of activated macrophages through the p38 mitogen-activated protein kinase/STAT1/reactive oxygen species pathway. **Molecular cell biology**, v. 25, n. 15, p. 6821–6833, 2005.

KIM, J. S. et al. Berberine induces FasL-related apoptosis through p38 activation in KB human oral cancer cells. **Oncology Reports**, v. 33, n. 4, p. 1775–1782, 2015.

KRUGER, C.; ABRAHAMSE, H. Utilisation of Targeted Nanoparticle Photosensitiser Drug Delivery Systems for the Enhancement of Photodynamic Therapy. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2628, 2018.

KUMAR, L. et al. Chemotherapy and targeted therapy in the management of cervical cancer. **Current Problems in Cancer**, v. 42, n. 2, p. 120–128, 2018.

KWON, S. B. et al. Cudrania tricuspidata stem extract induces apoptosis via the extrinsic pathway in SiHa cervical cancer cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–17, 2016.

LA, X. et al. Berberine-induced autophagic cell death by elevating GRP78 levels in cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 13, p. 20909–20924, 2017.

LEE, S. J. et al. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: Review of clinical and translational research. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 27, n. 5, p. 1–17, 2016.

LI, H. Y. et al. Celastrol induces apoptosis and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells: an in vitro and in vivo study. **Cell death & disease,** v. 6, n.1(e1604), 2015.

LIN, J. P. et al. GADD153 mediates berberine-induced apoptosis in human cervical cancer Ca ski cells. **Anticancer Research**, v. 27, n. 5 A, p. 3379–3386, 2007.

LIU, Q. et al. Berberine Induces Senescence of Human Glioblastoma Cells by Downregulating the EGFR-MEK-ERK Signaling Pathway. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, n. 2, p. 355–363, 2015.

LIU, C. S. et al. Research progress on berberine with a special focus on its oral bioavailability. **Fitoterapia**, v. 109, p. 274–282, 2016.

LOMAX, M. E.; FOLKES, L. K; O'NEILL, P. Biological consequences of radiationinduced DNA damage: Relevance to radiotherapy. **Clinical Oncology**, v. 25, n. 10, p. 578–585, 2013.

LÜ, Y. et al. Berberine regulates the microRNA-21-ITGB4-PDCD4 axis and inhibits colon cancer viability. **Oncology Letters**, v. 15, n. 4, p. 5971–5976, 2018.

MA, X. et al. The Pathogenesis of Diabetes Mellitus by Oxidative Stress and Inflammation: Its Inhibition by Berberine. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 782, 2018.

MAHATA, S. et al. Berberine modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells. **Molecular Cancer**, v. 10, p. 1–14, 2011.

MALEKI, S. N.; ABOUTALEB, N.; SOURI, F. Berberine confers neuroprotection in coping with focal cerebral ischemia by targeting inflammatory cytokines. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 87, p. 54–59, 2018.

MARTH, C. et al., Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 28, n. suppl\_4, p. iv72–iv83, 2017

MATSUZAKI, S. et al. Anti-glypican-1 antibody-drug conjugate exhibits potent preclinical antitumor activity against glypican-1 positive uterine cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 142, p. 1056-1066, 2018.

MISTRY, B. et al. Synthesis of 9-O-3-(1-piperazinyl/morpholinyl/piperidinyl) pentylberberines as Potential Antioxidant and Cytotoxic Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.16, n. 6, p. 713-721, 2016.

MISTRY, B. et al. Synthesis of *N*-Mannich bases of berberine linking piperazine moieties revealing anticancer and antioxidant effects. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.24, n.1, p. 36-44, 2017.

MISTRY, B. et al. Synthesis and Evaluation of Antioxidant and Cytotoxicity of the N-Mannich Base of Berberine Bearing Benzothiazole Moieties. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.17, n.12, p. 1652-1660, 2017.

MO, C. et al. The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 4, p. 574–588, 2014.

MOKWENA, M. G. et al. A review of nanoparticle photosensitizer drug delivery uptake systems for photodynamic treatment of lung cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 22, p. 147–154, 2018.

MOHAMED, M.S. et al. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. **Apoptosis**, v.22, n. 12, p. 1487–1509, 2017.

NAIDOO, C.; KRUGER, C. A.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic Therapy for Metastatic Melanoma Treatment: A Review. **Technology in Cancer Research & Treatment**, vol. 17, 2018.

NANASHIMA, A.; NAGAYASU, T. Current status of photodynamic therapy in digestive tract carcinoma in Japan. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 3434–3440, 2015.

NICOLÁS-PÁRRAGA, S. et al. Differential HPV16 variant distribution in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma. **International journal of cancer**, v.140, n. 9, p. 2092-2100, 2017.

OLIVO, M. et al. Targeted therapy of cancer using photodynamic therapy in combination with multi-faceted anti-tumor modalities. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 5, p. 1507–529, 2010.

ORTIZ, L. M. et al. Berberine, an epiphany against cancer. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12349–12367, 2014.

PACAUD, R. et al. The DNMT1/PCNA/UHRF1 disruption induces tumorigenesis characterized by similar genetic and epigenetic signatures. **Scientific Reports**, v. 4, n. 5 mC, p. 1–9, 2014.

PARK, S. H. et al. Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa2 pancreatic cell lines. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. *48, n.* 2, p. 111-119, 2014.

PARK Y.K., PARK C.H. Clinical efficacy of photodynamic therapy. **Obstetrics &** gynecology science, v. 59, n. 6, p. 479–488, 2016.

PAVITHRA, P. S.; MEHTA, A.; VERMA, R. S. Aromadendrene oxide 2, induces apoptosis in skin epidermoid cancer cells through ROS mediated mitochondrial pathway. **Life Sciences**, v. *197*, p. 19–29, 2018.

PEREIRA, G.C. et al. Mitochondrially-targetted Effects of Berberine on K1735-M2 Mouse Melanoma Cells–Comparison with Direct Effects on Isolated Mitochondrial Fractions. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 2, p. 636–649, 2007.

PORTILHO, F. A. et al. Antitumor activity of photodynamic therapy performed with nanospheres containing zinc-phthalocyanine. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2013.

PATHANIA, D.; MILLARD, M.; NEAMATI, N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1250–1275, 2009.

RAGHAV, D. et al. Berberine Induces Toxicity in HeLa Cells through Perturbation of Microtubule Polymerization by Binding to Tubulin at a Unique Site. **Biochemistry**, v. 56, n. 20, p. 2594–2611, 2017.

RIBAUDO, G. et al. Preliminary studies of berberine and its semi-synthetic derivatives as a promising class of multi-target anti-parkinson agents. **Natural Product Research**, v. 32, n. 12, p. 1395–1401, 2018.

RUBINSAK, L. A. et al. Treatment-Related Radiation Toxicity among Cervical Cancer Patients. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 28, n. 7, p. 1387–1393, 2018.

SAAVEDRA, K. P.; BREBI, P. M.; ROA, J. C. S. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. **Clinical Epigenetics**, v. 4, n. 1, p. 13, 2012.

SANCHEZ-MORENO, P. et al. Smart Drug-Delivery Systems for Cancer Nanotherapy. **Current Drug Targets**, v. 19, n. 4, p. 339–359, 2018.

SENNINO, B. et al. Inhibition of c-Met reduces lymphatic metastasis in RIP-Tag2 transgenic mice. **Cancer Research**, v. 73, p. 3692–3703, 2013.

SERAFIM, T. L. et al. Different concentrations of berberine result in distinct cellular localization patterns and cell cycle effects in a melanoma cell line. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 61, n. 6, p. 1007–1018, 2008.

SHIN, K. S. et al. Neurotoxic effects of berberine on long-term I-DOPA administration in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 6, p. 759–767, 2013.

SIMONE, C. B.; CENGEL, K. A. Photodynamic therapy for lung cancer and malignant pleural mesothelioma. **Seminars in Oncology**, v. 41, n. 6, p. 820–830, 2014.

SINHA, A.; P. K., S. Enhanced Induction of Apoptosis in HaCaT Cells by Luteolin Encapsulated in PEGylated Liposomes—Role of Caspase-3/Caspase-14. **Appl Biochem Biotechnol**, p. 1-18, 2018.

SO, K. et al. The impact of high-risk HPV genotypes other than HPV 16/18 on the natural course of abnormal cervical cytology: A Korean HPV cohort study original article purpose. **Cancer Research and Treatment**, v. 48, n. 4, p. 1313–1320, 2016.

SORIANO, J. et al. Cell death mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral human cell lines triggered by photodynamic treatments: Apoptosis, necrosis and parthanatos. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–13, 2017.

SPRING, B. Q. et al. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 14, n. 8, p. 1476–1491, 2015.

TAIT S. W. G.; Green D. R. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. **Oncogene**. v.27, n.50, p.6452–61, 2008.

TAN, W. et al. Berberine hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 1773–1777, 2011.

TANG, Q. L. et al. Antinociceptive effectof berberine on visceral hypersensitivity in rats. **World journal of gastroenterology**, v. 19, n. 28, p. 4582–4589, 2013.

TANG, W.; LEE, K. Inhibitory effects of Berberine on the migratory and invasive abilities of cancer cells. **Cancer Cell Microenviron**, p. 8–11, 2015.

TRUSHINA, O. I. et al. Photodynamic therapy of virus-associated precancer and early stages cancer of cervix uteri. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 5, n. 4, p. 256-259, 2008.

TSANG, C. et al. Berberine inhibits Rho GTPases and cell migration at low doses but induces G2 arrest and apoptosis at high doses in human cancer cells. **International Journal of Molecular Medicine**. v.24, n.1, p.131-8, 2009.

VUDDANDA, P. R.; CHAKRABORTY, S.; SINGH, S. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 19, n. 10, p. 1297-1307, 2010.

WANG, Y.; ZHANG, S. Berberine suppresses growth and metastasis of endometrial cancer cells via miR-101/COX-2. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, n. 36, p. 1287-1293, 2018.

WANG, Z. et al. Berberine acts as a putative epigenetic modulator by affecting the histone code. **Toxicology in Vitro**, v. 36, p. 10-17, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. World Cancer Report, v. 133, n. 9, p. 845-846, 2014.

WU, S. et al. Involvement of retinoblastoma-associated protein 48 during photodynamic therapy of cervical cancer cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 3, p. 1393-1400, 2017.

XIN, Y. et al. Demethoxycurcumin in combination with ultraviolet radiation B induces apoptosis through the mitochondrial pathway and caspase activation in A431 and HaCaT cells. **Tumor Biology**, vol. 39, no. 6, 2017.

YAN, X. et al. Mitochondria play an important role in the cell proliferation suppressing activity of berberine. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–13, 2017.

YIN, Z. et al. Signal pathways, diseases, and functions associated with the miR-19a/92a cluster and the use of berberine to modulate the expression of this cluster in multiple myeloma cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 6, p. e22057, 2018.

YIN, Z. et al. Epigenetic activation of WHSC1 functions as an oncogene and is associated with poor prognosis in cervical cancer. **Oncology Reports**, v. 37, n. 4, p. 2286–2294, 2017.

YOO, J.; HA, K. S. New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death. International Review of Cell and Molecular Biology, v. 295, p.139–174.

ZACAPALA-GÓMEZ, A. E. et al. Ezrin and E-cadherin expression profile in cervical cytology: A prognostic marker for tumor progression in cervical cancer. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

ZHANG, W. et al. Efficacy and safety of photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia and human papilloma virus infection. **Medicine**, v. 97, n.21(e10864), p. 1–8, 2018.

ZHENG, L.Z. et al. Abstract A127: Combination therapy targeting EGFR/MET crosstalk using nanotechnology improves photodynamic therapy treatment of pancreatic cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.8, p. A127–A127, 2009.

ZHOU, X. Q. et al. Neuroprotective effects of berberine on stroke models in vitro and in vivo. **Neuroscience Letters**, v. 447, n. 1, p. 31–36, 2008.

ZONG, W. X.; RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Mitochondria and Cancer. **Molecular Cell**, v. 61, p. 667–676, 2016.